

⑫ 公表特許公報(A)

平5-505459

⑬ 公表 平成5年(1993)8月12日

⑭ Int. Cl.⁸
G 01 N 27/327

識別記号

庁内整理番号

7235-2 J
7235-2 J審査請求 未請求
予備審査請求 有

G 01 N 27/30

3 5 3 R
3 5 3 Z※

部門(区分) 6(1)

(全 18 頁)

⑮ 発明の名称 新規バイオセンサーおよびその使用方法

⑯ 特 願 平3-502803

⑰ 出 願 平2(1990)12月14日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)6月12日

⑲ 国際出願 PCT/US90/07374

⑳ 国際公開番号 WO91/09139

㉑ 国際公開日 平3(1991)6月27日

優先権主張 ㉒ 1989年12月15日 ㉓ 米国(U S) ㉔ 451,671

㉕ 発 明 者 ガーバー, マーチン・ティー アメリカ合衆国46032インディアナ州、カーメル、ネベル・レイン9
69番㉖ 出 願 人 ベーリンガー・マンハイム・コ アメリカ合衆国46250-0528インディアナ州、インディアナポリ
ーボレイション ス、ビー・オー・ボックス50528 (番地の表示なし)

㉗ 代 理 人 弁理士 青 山 蓑 外1名

㉘ 指 定 国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C A, C H(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域
特許), F R(広域特許), G B(広域特許), G R(広域特許), I T(広域特許), J P, K R, L U(広域特許), N
L(広域特許), S E(広域特許)

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. a. 第1電気絶縁体;
 - b. 同一の導電性物質から作られ、かつ第1電気絶縁体上に支持されている実質的に同一の大きさの作用電極および対電極;
 - c. 第1電気絶縁体および電極に上塗りし、かつ作用電極および対電極の実質的に等しい表面積を暴露する切欠部を含む第2電気絶縁体;ならびに
 - d. 切欠部において暴露される電極表面を実質的に被覆し、かつ酸化還元メディエーターの酸化型、酵素および緩衝液からなる試薬からなり、
- 該酸化還元メディエーターの酸化型が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応から少なくとも1個の電子を受容するのに十分なタイプであり、かつ拡散限定電気酸化によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって確実に限定するのに十分な量であり、
- 該酵素が酵素、分析物および酸化還元メディエーターの酸化型を

含む反応を触媒するのに十分なタイプおよび十分な量であり、

該緩衝液が酸化還元メディエーターの還元型よりも高い酸化電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに十分なタイプおよび十分な量であることを特徴とする分析物分析装置。

2. 試薬がさらに、試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに十分なタイプおよび十分な量の微結晶性物質からなる請求項1記載の装置。

3. 試薬がさらに、少なくとも1つのさらなる酵素およびさらなる酸化還元メディエーターからなる請求項1記載の装置。

4. 作用電極および対電極の導電性物質がパラジウム、白金、金、銀、チタン、銅、および炭素からなる群から選択される請求項1記載の装置。

5. 試薬がさらに、分析物を含有する試料を湿潤させるのに十分なタイプおよび十分な量の界面活性剤からなる請求項2記載の装置。

6. 試薬がさらに、試薬を安定させるのに十分なタイプおよび充

分な量の試薬安定剤からなる請求項5記載の装置。

7. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩であり、酵素がグルコースオキシダーゼである請求項1記載の装置。

8. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩であり、酵素がグルコースオキシダーゼである請求項2記載の装置。

9. ヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩の量が試薬1g当たり約0.55～約3.5ミリモルである請求項8記載の装置。

10. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩であり、緩衝液がリン酸塩であり、微結晶性物質が微結晶性セルロースおよび微結晶性カルボキシメチルセルロースを含み、酵素がグルコースオキシダーゼであり、界面活性剤がノニオン界面活性剤であり、試薬安定剤がグルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、ブルーデキストラン、およびトレハロースからなる群から選択される請求項6記載の装置。

2) 試薬1g当たりリン酸緩衝液約1.3～約1.9ミリモル、

3) 試薬1g当たりグルコースオキシダーゼ約2300～約10,400単位、

4) 試薬1g当たり微結晶性セルロース約50～約71mg、

5) 試薬1g当たり微結晶性カルボキシメチルセルロース約2～約3mg、

6) 試薬1g当たりTRITON X-100約2～約3mg、および

7) 試薬1g当たりグルタミン酸塩約71～約102mg

からなる試薬

からなることを特徴とするグルコース分析装置。

13. さらに、

e. 作用電極および対電極と電気的に連結され、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに十分な電位差を作用電極および対電極間に供給することができる

特表平5-505459 (2)

11. ヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩の量が試薬1g当たり約0.55～約3.5ミリモルであり、リン酸緩衝液の量が試薬1g当たり約0.35～約2.6ミリモルであり、微結晶性物質の量が試薬1g当たり約36～約228mgであり、グルコースオキシダーゼの量が試薬1g当たり約570単位よりも多く、界面活性剤の量が試薬1g当たり約0～約18mgであり、試薬安定剤の量が試薬1g当たり約0～約200mgである請求項10記載の装置。

12. a. 第1電気絶縁体；

b. パラジウムから作られ、かつ第1電気絶縁体上で支持される実質的に同一の大きさの作用電極および対電極；

c. 第1電気絶縁体および電極に上塗りし、かつ作用電極および対電極の実質的に等しい表面積を露出する切欠部を含む第2電気絶縁体；ならびに

d. 切欠部において露出される電極表面を実質的に被覆し、かつ

1) 試薬1g当たりヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩約1.1～約1.5ミリモル、

電源；ならびに

f. 作用電極および対電極と電気的に連結し、作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって生じる拡散限定電流を測定することができる計量器からなる請求項1記載の装置。

14. さらに、

e. 作用電極および対電極と電気的に連結され、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに十分な電位差を作用電極および対電極間に供給することができる電源；ならびに

f. 作用電極および対電極と電気的に連結し、作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって生じる拡散限定電流を測定することができる計量器からなる請求項7記載の装置。

15. 第2電気絶縁体がさらに作用電極および対電極の一部を露出するさらなる切欠部を含み、装置がさらに、

e. さらなる切欠部で作用電極および対電極と電気的に連結され、かつ作用電極の表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに十分な電位差を作用電極および対電極間に供給することができる電源；ならびに

1. 作用電極および対電極と電気的に連結し、作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって生じる拡散限定電流を測定することができる計量器

からなる請求項12記載の装置。

16. 酸化還元メディエーターの酸化型、酵素、および緩衝液からなり、

該酸化還元メディエーターの酸化型が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応から少なくとも1個の電子を受容するのに十分なタイプであり、かつ拡散限定電気酸化によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって確實に限定するのに十分な量であり、

該酵素が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型

21. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩であり、緩衝液がリン酸塩であり、微結晶性物質が微結晶性セルロースおよび微結晶性カルボキシメチルセルロースを含み、酵素がグルコースオキシダーゼであり、界面活性剤がノニオン界面活性剤であり、試薬安定剤がグルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、ブルーデキストラン、およびトレハロースからなる群から選択される請求項20記載の試薬。

22. ヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩の量が試薬1g当たり約0.55～約3.5ミリモルであり、リン酸塩緩衝液の量が試薬1g当たり約0.35～約2.6ミリモルであり、微結晶性物質の量が試薬1g当たり約36～約228mgであり、グルコースオキシダーゼの量が試薬1g当たり約570単位より多く、界面活性剤の量が試薬1g当たり約0～約18mgであり、試薬安定剤の量が試薬1g当たり約0～約200mgである請求項21記載の試薬。

23. a. 試薬1g当たりヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩約1.1～約1.5ミリモル；

を含む反応を触媒するのに十分なタイプおよび十分な量であり、

該緩衝液が酸化還元メディエーターの還元型の酸化電位

を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに十分なタ

イプおよび十分な量である

ことを特徴とする、作用電極および対電極を有し、かつ分析物を測定する電気化学的装置のための試薬。

17. 試薬がさらに、少なくとも1つのさらなる酵素およびさらなる酸化還元メディエーターからなる請求項18記載の試薬。

18. さらに、試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに十分なタイプおよび充分な量の微結晶性物質からなる請求項16記載の試薬。

19. さらに、分析物含有試料を湿潤させるのに十分なタイプおよび充分な量の界面活性剤からなる請求項18記載の試薬。

20. さらに、試薬を安定させるのに十分なタイプおよび充分な量の試薬安定剤からなる請求項19記載の試薬。

b. 試薬1g当たりリン酸塩緩衝液約1.3～約1.9ミリモル、

c. 試薬1g当たりグルコースオキシダーゼ約2300～約10,400単位；

d. 試薬1g当たり微結晶性セルロース約50～約71mg；

e. 試薬1g当たり微結晶性カルボキシメチルセルロース約2～約3mg；

f. 試薬1g当たりTRITON X-100約2～約3mg；および

g. 試薬1g当たりグルタミン酸塩約71～約102mg

からなることを特徴とする、作用電極および対電極を有し、かつグルコースを測定する電気化学的装置のための試薬。

24. a. 作用電極および対電極の實質的に等しい表面積を被覆し、かつ酸化還元メディエーターの酸化型、酵素、および緩衝液を含む試薬と液体を接触させ

〔ここで、酸化還元メディエーターの酸化型は酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応から少なくとも1個

の電子を受容するのに充分なタイプであり、かつ拡散限定電気酸化によって生じた電流を作用電極表面での酸化還元メディエータ(4)還元型の酸化によって確実に限定するのに充分な量であり、

該酵素は酵素、分析物、および酸化還元メディエータの酸化型を含む反応を触媒するのに充分なタイプおよび充分な量であり、

該緩衝液は酸化還元メディエータの還元型よりも高い酸化電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエータの酸化型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに充分なタイプおよび充分な量である]；

b. 該酵素、分析物、および酸化還元メディエータの酸化型を含む反応を完了させ；

c. 次いで、作用電極の表面で酸化還元メディエータの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに充分な電位差を電極間に印加し；

d. その後、生じる拡散限定電流を測定し；

e. 液体中の分析物の濃度と電流測定値に関連させる工程からなることを特徴とする液体中の分析物濃度測定方法。

なる群から選択される請求項27記載の方法。

29. ヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩の量が試薬1g当たり約0.55～約3.5ミリモルであり、リン酸緩衝液の量が試薬1g当たり約0.35～約2.8ミリモルであり、微結晶性物質の量が試薬1g当たり約36～約228mgであり、グルコースオキシダーゼの量が試薬1g当たり約570単位より多く、界面活性剤の量が試薬1g当たり約0～約18mgであり、試薬安定剤の量が試薬1g当たり約0～約200mgである請求項28記載の試薬。

30. a. 作用電極および対電極の実質的に等しい表面積を被覆し、かつ

試薬1g当たりヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩約1.1～約1.5ミリモル、

試薬1g当たりリン酸緩衝液約1.3～約1.9ミリモル、

試薬1g当たりグルコースオキシダーゼ約2300～約10400単位、

試薬1g当たり微結晶性セルロース約50～約71mg、

25. 試薬がさらに、少なくとも1つのさうなる酵素およびさうなる酸化還元メディエータを含有する請求項24記載の方法。

26. 試薬がさらに、試薬中で酸化還元メディエータを分散させるのに充分なタイプおよび充分な量の微結晶性物質を含む請求項24記載の方法。

27. 試薬がさらに、

試薬との接触によって液体を湿潤させるのに充分なタイプおよび充分な量の界面活性剤、および

試薬を安定させるのに充分なタイプおよび充分な量の試薬安定剤を含む請求項26記載の方法。

28. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエータの酸化型がヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩であり、緩衝液がリン酸塩であり、微結晶性物質が微結晶性セルロースおよび微結晶性カルボキシメチルセルロースを含有、酵素がグルコースオキシダーゼであり、界面活性剤がノニオン界面活性剤であり、試薬安定剤がグルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、ブルーデキストラン、およびトレハロースから

試薬1g当たり微結晶性カルボキシメチルセルロース約2～約3mg、および

試薬1g当たりグルタミン酸塩約71～約102mg

を含む試薬と液体を接触させ；

b. 酵素、分析物、および酸化還元メディエータの酸化型を含む反応を完了させ；

c. 次いで、作用電極の表面で酸化還元メディエータの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに充分な電位差を電極間に印加し；

d. その後、生じる拡散限定電流を測定し；

e. 液体中のグルコースの濃度を電流測定値に関連させる工程からなることを特徴とする液体中のグルコース濃度測定方法。

31. a. 第1電気絶縁体；

b. 同一の導電性物質から作られ、かつ第1電気絶縁体上で支持される実質的に同一の大きさの作用電極および対電極；

c. 第1電気絶縁体および電極に上塗りし、かつ作用電極および対電極の実質的に等しい表面積を露出する切欠部を含む第2電気絶

媒体：および

d. 切欠部において暴露される電極表面を実質的に被覆し、⁽⁵⁾酸化還元メディエーターの還元型、酵素、および緩衝液からなる試薬からなり、

該酸化還元メディエーターの還元型が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応から少なくとも1個の電子を供与するのに十分なタイプであり、かつ拡散限定電気還元によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって確実に限定するのに十分な量であり、

該酵素が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を触媒するのに十分なタイプおよび十分な量であり、

該緩衝液が酸化還元メディエーターの酸化型よりも低い還元電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに十分なタイプおよび十分な量であることを特徴とする分析物分析用装置。

3.2. 試薬がさらに、

うなり、

該酸化還元メディエーターの還元型が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応から少なくとも1個の電子を供与するのに十分なタイプであり、かつ拡散限定電気酸化によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって確実に限定するのに十分な量であり、

該酵素が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を触媒するのに十分なタイプおよび十分な量であり、

該緩衝液が酸化還元メディエーターの酸化型よりも低い還元電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに十分なタイプおよび十分な量である

ことを特徴とする、作用電極および対電極を有し、かつ分析物を測定する電気化学的装置のための試薬。

3.5. さらに、

試料中で酸化還元メディエーターを分散させるのに十分なタイプ

特表平5-505459 (5)

試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに十分なタイプ

および十分な量の微結晶性物質 特表平5-505459

分析物含有試料を湿潤させるのに十分なタイプおよび十分な量の界面活性剤、および

試薬を安定させるのに十分なタイプおよび十分な量の試薬安定剤からなる請求項3.1記載の装置。

3.3. さらに、

e. 作用電極および対電極と電気的に連結され、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの酸化型の拡散限定電気還元を生じるのに十分な電位差を作用電極および対電極間に供給することができる電源；ならびに

f. 作用電極および対電極と電気的に連結し、作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって生じる拡散限定電流を測定することができる計量器

からなる請求項3.1記載の装置。

3.4. 酸化還元メディエーターの還元型、酵素、および緩衝液か

および十分な量の微結晶性物質；

分析物含有試料を湿潤させるのに十分なタイプおよび十分な量の界面活性剤；および

試薬を安定させるのに十分なタイプおよび十分な量の試薬安定剤からなる請求項3.4記載の試薬。

3.6. a. 作用電極および対電極の実質的に等しい表面積を被覆し、かつ酸化還元メディエーターの還元型、酵素、および緩衝液を含む試薬と液体を接触させ

[ここで、酸化還元メディエーターの還元型は酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応から少なくとも1個の電子を供与するのに十分なタイプであり、かつ拡散限定電気酸化によって生じた電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって確実に限定するのに十分な量であり、

該酵素は酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を触媒するのに十分なタイプおよび十分な量であり、

該緩衝液は酸化還元メディエーターの酸化型よりも低い還元電位

を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに十分な(b)イプおよび充分な量である]；

b. 該酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を完了させ；

c. 次いで、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの酸化型の拡散限定電気還元を生じるのに充分な電位差を電極間に印加し；

d. その後、生じる拡散限定電流を測定し；

e. 液体中の分析物の濃度と電流測定値を関連させる

工程からなることを特徴とする液体中の分析物濃度測定方法。

37. 試薬がさらに、

試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに充分なタイプおよび充分な量の微結晶性物質、

分析物含有試料を湿潤させるのに充分なタイプおよび充分な量の界面活性剤、および

試薬を安定させるのに充分なタイプおよび充分な量の試薬安定剤

を含む反応を触媒するのに充分なタイプおよび充分な量であり、

該緩衝液が酸化還元メディエーターの還元型よりも高い酸化電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに充分なタイプおよび充分な量であることを特徴とする分析物分析装置。

39. 試薬がさらに、試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに充分なタイプおよび充分な量の微結晶性物質からなる請求項38記載の装置。

40. 試薬がさらに、少なくとも1つのさらなる酵素およびさらなる酸化還元メディエーターからなる請求項38記載の装置。

41. 作用電極および対電極の導電性物質がパラジウム、白金、金、銀、チタン、銅、および炭素からなる群から選択される請求項38記載の装置。

42. 試薬がさらに、分析物含有試料を湿潤させるのに充分なタイプおよび充分な量の界面活性剤からなる請求項39記載の装置。

43. 試薬がさらに、試薬を安定化させるのに充分なタイプおよ

特表平5-505459 (6)

を含む請求項38記載の方法。

38. a. 第1電気絶縁体：特表平5-505459

b. 同一の導電性物質から作られ、かつ第1電気絶縁体上で支持されている作用電極および該作用電極よりも小さい対電極；

c. 第1電気絶縁体および電極に上塗りし、作用電極よりも小さい対電極の表面積を暴露する切欠部を含む第2電気絶縁体；および

d. 切欠部において暴露された電極表面を実質的に被覆し、かつ酸化還元メディエーターの酸化型、酵素、および緩衝液からなる試薬

からなり、

該酸化還元メディエーターの酸化型が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応から少なくとも1個の電子を受容するのに充分なタイプであり、かつ拡散限定電気酸化によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって確實に限定するのに充分な量であり、

該酵素が酵素、分析物および酸化還元メディエーターの酸化型を

び充分な量の試薬安定剤からなる請求項42記載の装置。

44. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩であり、酵素がグルコースオキシダーゼである請求項38記載の装置。

45. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩であり、酵素がグルコースオキシダーゼである請求項39記載の装置。

46. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩であり、緩衝液がリン酸塩であり、微結晶性物質が微結晶性セルロースおよび微結晶性カルボキシメチルセルロースを含み、酵素がグルコースオキシダーゼであり、界面活性剤がノニオン界面活性剤であり、試薬安定剤がグルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、ブルーデキストラン、およびトレハロースからなる群から選択される請求項43記載の装置。

47. さらに、

e. 作用電極および対電極と電気的に連結され、かつ作用電極の

表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに十分な電位差を作用電極および対電極間に供給すること(7)で
きる電源；および

1. 作用電極および対電極と電気的に連結し、かつ作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって生じる拡散限定電流を測定することができる計量器
からなる請求項38記載の装置。

48. a. 作用電極よりも小さい対電極の表面積を被覆し、かつ酸化還元メディエーターの酸化型、酵素、および緩衝液を含む試薬と液体を接触させ

[ここで、酸化還元メディエーターの酸化型は酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応から少なくとも1個の電子を受容するのに十分なタイプであり、かつ拡散限定電気酸化によって生じた電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって確実に限定するのに十分な量であり、

該酵素は酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型

48記載の方法。

51. 試薬がさらに、

試薬との接触によって液体を湿潤させるのに十分なタイプおよび充分な量の界面活性剤、および

試薬を安定させるのに十分なタイプおよび充分な量の試薬安定剤を含む請求項50記載の方法。

52. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(Ⅱ)酸塩であり、緩衝液がリン酸塩であり、微結晶性物質が微結晶性セルロースおよび微結晶性カルボキシメチルセルロースを含み、酵素がグルコースオキシダーゼであり、界面活性剤がノニオン界面活性剤であり、試薬安定剤がグルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、ブルーデキストラン、およびトレハロースからなる群から選択される請求項51記載の方法。

53. a. 第1電気絶縁体；

b. 同一の導電性物質から作られ、かつ第1電気絶縁体上で支持される作用電極および該作用電極よりも小さい対電極；

特表平5-505459 (7)

を含む反応を触媒するのに十分なタイプおよび充分な量であり、

該緩衝液は酸化還元メディエーターの還元型の酸化電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに十分なタイプおよび充分な量である]；

b. 該酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を完了させ；

c. 次いで、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに十分な電位差を電極間に印加し；

d. その後、生じる拡散限定電流を測定し；

e. 液体中の分析物の濃度と電流測定値を関連させる
工程からなることを特徴とする液体中の分析物濃度測定方法。

49. 試薬がさらに、少なくとも1つのさらなる酵素およびさらなる酸化還元メディエーターを含む請求項48記載の方法。

50. 試薬がさらに、試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに十分なタイプおよび充分な量の微結晶性物質を含む請求項

c. 第1電気絶縁体および電極に上塗りし、かつ作用電極よりも小さい対電極の表面積を暴露する切欠部を含む第2電気絶縁体；および

d. 切欠部において暴露される電極表面を実質的に被覆し、かつ酸化還元メディエーターの還元型、酵素、および緩衝液からなる試薬からなり、

該酸化還元メディエーターの還元型が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応から少なくとも1個の電子を供与するのに十分なタイプであり、かつ拡散限定電気還元によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって確実に限定するのに十分な量であり、

該酵素が酵素、分析物、および酸化還元型メディエーターの還元型を含む反応を触媒するのに十分なタイプおよび充分な量であり、

該緩衝液が酸化還元メディエーターの酸化型よりも低い還元電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに十分なタ

タイプおよび充分な量であることを特徴とする分析物分析装置。

54. 試薬がさらに、

(8)

試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに充分なタイプおよび充分な量の微結晶性物質、

分析物含有試料を湿潤させるのに充分なタイプおよび充分な量の界面活性剤、および

試薬を安定させるのに充分なタイプおよび充分な量の試薬安定剤からなる請求項53記載の装置。

55. さらに、

e. 作用電極および対電極と電気的に連絡され、かつ作用電極の表面で酸化還元メディエーターの酸化型の拡散限定電気還元を生じるのに充分な電位差を作用電極および対電極間に供給することができる電源；および

f. 作用電極および対電極と電気的に連絡し、作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって生じる拡散限定電流を測定することができる計量器

含む反応を完了させ；

c. 次いで、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの酸化型の拡散限定電気還元を生じるのに充分な電位差を電極間に印加し；

d. その後、生じる拡散限定電流を測定し；

e. 液体中の分析物の濃度と電流測定値を関連させる

工程からなる液体中の分析物濃度測定方法。

57. 試薬がさらに、

試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに充分なタイプおよび充分な量の微結晶性物質、

試薬と接触させることによって液体を湿潤させるのに充分なタイプおよび充分な量の界面活性剤、および

試料を安定させるのに充分なタイプおよび充分な量の試薬安定剤からなる請求項56記載の方法。

特表平5-505459 (8)

からなる請求項53記載の装置。

56. a. 作用電極よりも小さい酸化還元電位の酸化還元メディエーターの還元型、酵素、および緩衝液を含む試薬と液体を接触させ

[ここで、酸化還元メディエーターの還元型は酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応から少なくとも1個の電子を供与するのに充分なタイプであり、かつ拡散限定電気還元によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって確実に限定するのに充分な量であり、

該酵素は酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を触媒するのに充分な量であり、

該緩衝液は酸化還元メディエーターの酸化型よりも低い還元電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに充分なタイプおよび充分な量である]；

b. 該酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を

明 細 書

新規バイオセンサーおよびその使用方法

関連出願相互参照

本出願は1989年12月15日に出願した米国特許出願第07/451,671号の一部継続である。

発明の分野

本発明は、一般に、液中の分析物濃度測定に関し、さらに詳細には、このような測定に使用するための電流測定バイオセンサーに関する。

発明の背景

バイオセンサーは新しくない。液中の種々の分析物の濃度の測定におけるそれらの使用も知られている。

ナンカイら(Nankai et al.) (1988年12月31日に公開されたWO88/07632)は、グルコース含有液をグルコースオキシダーゼおよびヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸カリウムと接触させる電流

測定バイオセンサーシステムを開示している。グルコースを酸化し、ヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩をヘキサシアノ鉄(Ⅱ)酸塩に還元する(90)にの反応はグルコースオキシダーゼによって触媒される。) 2分後、電位を印加し、ヘキサシアノ鉄(Ⅱ)酸塩からヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩への再酸化によって生じる電流を得る。該電位を印加して数秒後に得られる電流値は液中のグルコースの濃度と関連する。

ナンカイらが電位の印加前にグルコースおよびヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩の反応を完全に行う方法を開示しているので、この方法を電流測定測定の「終点」法と称する。

ナンカイらはグルコースオキシダーゼおよびヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸カリウムを不織ナイロンメッシュ上に保持するシステムを開示している。該メッシュは作用電極、対電極および参照電極と接触するように配置される。対電極および参照電極の合計表面積は作用電極の2倍である。

ウェゴマン(Wosonan) (1986年12月30日に公開されたEP0206218)は、異なる導電性物質から作られる2つの電極

対電極が作用電極より長い二電極システム。

電気化学技術分野における従来の識者は、バイオセンサーが、作用電極および対電極が実質的に同一の大きさであり(または対電極が作用電極よりも小さく)、同一の導電性物質から作られる二電極システムを含み得ることを提案していない。

発明の概要

本発明は、新規バイオセンサー(電気化学的装置)およびその使用方法である。該バイオセンサーは、同一の導電性物質から作られ、かつ第1電気絶縁体に貼付された実質的に同一の大きさの作用電極および対電極を含む。作用電極および対電極の実質的に等しい表面積を露出する切欠部を含む第2電気絶縁体を電極に上塗りする。

試薬は該切欠部に添加される。該試薬は切欠部において露出される電極表面を実質的に被覆し、酸化還元メディエーター、酵素および緩衝液を含む。

分析物含有試料を該試薬に添加すると、酸化還元メディエーターは還元される(少なくとも1個の電子を受容する)かまたは酸化され

特表平5-505459 (9)

を有するバイオセンサーを開示している。例えば、陽極は白金のような陽極材料から形成され、陰極は白金のような陰極材料から形成される。陽極は酵素で塗布される。好ましい具体例において、塗布された電極はグルコースを透過することができるエラストマーで被覆されている。

ポットゲンら(Pottgen et al.) (1989年9月21日に公開されたWO89/08713)は、電極が同一の貴金属から作られるが、該電極の一方(擬参照電極と称する)が他方(作用)電極よりも長い二電極バイオセンサーの使用を開示している。

電気化学技術分野における従来の識者は以下のタイプのバイオセンサーを提案している:

- 1) 作用電極が参照電極(例えば、銀/塩化銀)に対して照合され、対電極が電流の流れのための手段を提供する三電極システム;
- 2) 作用電極および対電極が異なる導電性物質から作られる二電極システム; ならびに
- 3) 作用電極および対電極が同一の導電性物質から作られるが、

る(少なくとも1個の電子を供与する)かいずれかである反応において分析物、酵素および酸化還元メが沈殿する。通常、この反応において、分析物は酸化され、酸化還元メディエーターは還元される。この反応(ここで、分析物が酸化され、酸化還元メディエーターが還元される)が終了した後、該電極間に電位差が印加される。対電極での酸化還元メディエーターの酸化型の量および印加された電位差は作用電極の表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに充分でなければならない。短時間遅延の後、酸化還元メディエーターの還元型の電気酸化によって生じる電流を測定し、観察された電流は試料中の分析物の量と関連される。

試薬が、作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって、電気酸化中に生じる電流を確実に限定するのに十分な量の酸化還元メディエーターの酸化型を含む場合、同一の導電性物質から作られた実質的に同一の大きさの2つの電極だけが必要であるのが重要である。

作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によ

て限定されるべき電気酸化中に生じる電流について、対電極の表面での酸化還元メディエーターの酸化型の量は常に作用電極の表面(10)の酸化還元メディエーターの還元型の量を超えなければならない。

図面の簡単な説明

第1図は試薬およびメッシュ被覆を除く本発明バイオセンサーの好ましい具体例の略平面図である。

第2図は試薬およびメッシュ被覆を含む第1図の層2-2に沿った本発明のバイオセンサーの略正面図である。

第3図はメッシュ被覆を含む本発明のバイオセンサーの好ましい具体例の略平面図である。

発明の詳細な説明

第1図～第3図をさらに詳細に引用して、本発明のバイオセンサーの現在の好ましい具体例を示す。

バイオセンサー1は第1および第2電気絶縁層2および3からなる。いずれの有用な絶縁材料も適切であろう。典型的には、ビニルポリマーおよびポリイミドのようなプラスチックが望ましい電氣的

貴金属よりも空気酸化され易いので好ましくない。好ましくは、電極4および5は厚さ約0.1ミクロンであり、基材7は厚さ約25ミクロンである[コートルズ-アンドス・パフォーマンス・フィルムズ・イン・カリフォルニア・アンド・サウスウェール・テクノロジーズ、インコーポレイテッド(Courtalls-Andus Performance Films in California and Southwell Technologies, Inc.)から商業的に入手可能](第2図)。

電極4および5は一方の電極での電気化学的事象が他方の電極での電気化学的事象を妨害しないように十分に離されなければならない。電極4および5の間の好ましい距離は約1.2ミリメートル(mm)である。

好ましい具体例において、基材7に貼付された電極4および5はリールから繰り出されず、熱溶融接着剤(示されていない)の使用によって層2に付着される。また、電極4および5は平行に配置されて層2の一方の端部から他の端部まで伸びているのが好ましい(第1図)。

および構造的特性を提供する。

第1図～第3図に示すバイオセンサー1は十分に可撓性であり、かつ同時に、最終バイオセンサーに有用な剛さを与えるのに十分に剛い材料の選択を必要とする材料のロールから製造される塊であることが意図される。

層2および3はいずれの有用な厚さであってもよい。好ましい具体例において、層2は厚さ約360ミクロンであり、層3は厚さ約250ミクロンである。

作用電極4および対電極5は好ましくはポリイミドのような絶縁材料の基材7上に配置され、層2に貼付される前に電極を引き裂く可能性を低下させる。作用電極4および対電極5は実質的に同一の大きさであり、同一の導電性物質から作られる。使用し得る導電性物質の例は、パラジウム、白金、金、銀、炭素、チタン、および銅である。貴金属は、より一定の再現可能な電極表面積を提供するので好ましい。パラジウムは、より酸化しにくい貴金属の1つであり、かつ相対的に安価な貴金属であるので好ましい。銀は、上記の他の

絶縁層3は熱溶融接着剤(示されていない)の使用によって層2ならびに電極4および5の上部に固着される。層3は、試薬ウエル9を定義し、かつ電極4および5の実質的に等しい表面積10を暴露する切欠部8を含む。

好ましい具体例において、切欠部8は4mm×6mmであり、電極4および5は各々幅1.5mmである。したがって、2つの電極の各々について表面積約6mm²が暴露される。

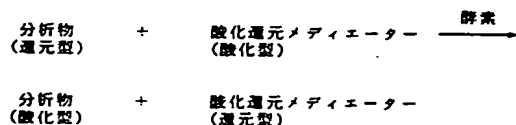
また、バイオセンサー1は、作用電極および対電極と電氣的に連結している電源(示されていない)ならびに作用電極および対電極と電氣的に連結している電流計(示されていない)も含む。

バイオセンサー試薬11(第2図)は電極4および5の暴露表面10の実質的に全てを被覆するように、好ましくは該電極間の層2の暴露表面を被覆するようにウエル9中に配置される。

最小限、試薬11は酸化還元メディエーターの酸化型、酵素および緩衝液を含む。該酸化還元メディエーターの酸化型は、酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応から少な

くとも1個の電子を受容するのに充分なタイプのものでなければならない。(酸化還元メディエーターなる語は電気化学的可逆的酸化還元反応を受けることができるメディエーターを意味する。) 該酵素は酵素、分析物および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を触媒するのに充分なタイプおよび充分な量でなければならない。該緩衝液は、酵素、分析物および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を該酵素が触媒するpHを提供し、維持するのに充分なタイプのものおよび充分な量でなければならない。

一般的に、分析物含有試料を試薬に添加すると、以下に示すとおり該分析物が酸化され、該酸化還元メディエーターの酸化型が還元される：



上記反応は完了させられる。[完了は、分析物濃度を作用電極の表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって生じる拡散

酸化還元メディエーターを使用することによって、および拡散限定電気酸化中に生じる電流を作用電極での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって確実に制限するのに充分な量の酸化還元メディエーターの酸化型を試薬1に供給することによって満足される。作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって限定されるべき電気酸化中に生じる電流について、対電極の表面での酸化還元メディエーターの酸化型の量は、常に作用電極の表面での酸化還元メディエーターの還元型の量を超えなければならない。

以下に記載するように、試薬が過剰の酸化還元メディエーターの酸化型を含む場合、作用電極および対電極は実質的に同一の大きさであってよく、かつ同一の導電性物質から作られてよい。実質的に同一の大きさであり、かつ同一材料から作られる電極の利用能はバイオセンサーを製造するために重要な長所を表す。

試薬のさらなる必要条件は使用される緩衝液が酸化還元メディエーターの還元型よりも高い酸化電位を有しなければならないということである。

限定電流と関連させるのに充分な分析物、酵素、および酸化還元メディエーター(酸化型)を含む反応系を、図1504に示した。後、電源(例えば、バッテリー)は電極間に電位差を印加する。電位差を印加する場合、対電極での酸化還元メディエーターの酸化型の量および電位差は作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに充分でなければならない。作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって生じる拡散限定電流を電流計によって測定する。

測定された電流は以下の必要条件が満足される場合に試料中の分析物の濃度に正確に関連され得る：

- 1) 酸化還元メディエーターの還元型の酸化速度が作用電極の表面に対する酸化還元メディエーターの還元型の拡散速度によって左右される；および
- 2) 生じた電流が作用電極の表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって限定される。

本発明の装置において、これらの必要条件は、容易に可逆できる

使用される酵素のタイプは測定されるべき分析物に依存するであろう。例えば、グルコースが測定されるべき分析物であるならば、グルコースオキシダーゼが酵素として使用されてよい。コレステロールが測定されるべき分析物であるならば、コレステロールオキシダーゼが酵素として使用されてよい。

前記説明のように、酸化還元メディエーターは容易に可逆できなければならない、酸化還元メディエーターの酸化型は酵素、分析物および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応から少なくとも1個の電子を受容するのに充分なタイプでなければならない。例えば、グルコースが測定されるべき分析物であり、グルコースオキシダーゼが酵素である場合、ヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩またはキノンが酸化還元メディエーターの酸化型であってよい。

本発明によって個々の分析物を測定する際に使用してよい酵素および酸化還元メディエーター(酸化型)の他の例を下記第1表に示す。

とも1つのさらなる酵素が使用 **特許平 8-50154** 号の例の

試薬中に含まれる酵素の量は、分析物、酵素、および酸化還元元（ディエーター）の酸化型を含む反応の完了のための所望の時間に依存して変わり得る。酵素の添加量が多いほど反応の完了のための時間は短い。グルコース試薬がグルコースオキシダーゼを含む場合、試薬中に試薬（電極表面上で乾燥する前の試薬組成物に関する）1 当たり約 0.5×10^6 国際単位（単位）を超えるグルコースオキシダーゼを使用すべきであり、好ましくは、試薬 1 当たり約 2×10^6 単位のグルコースオキシダーゼを使用する。試薬 1 当たり約 0.5×10^6 以下では、検定性能が劣る。試薬 1 当たり約 2×10^6 単位のグルコースオキシダーゼは、反応についての好都合な短時間、約

酸化還元メディエーターを分散させるであろう微結晶性物質の例は、微結晶性セルロース、デキストラン、およびキチンである。グルコースオキシダーゼおよびヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸カリウムを含む好ましいグルコース試薬中に含まれる微結晶性物質の量は、約1%(重量:容量)〜約4.5%(重量:容量)、好ましくは約1.5%(重量:容量)である。微結晶性物質約1%(重量:容量)以下では、乾燥後、試薬が電極表面から落ちるであろう。微結晶性物質約4.5%(重量:容量)以上では、試薬はゲル化する。ヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩およびグルコースオキシダーゼを含むグルコース試薬について、好ましい微結晶性物質はAVICEL RC-591F[エフエムシー・コーポレーション(FMC Corp.)から入手可能な微結晶性セルロース]およびNATROSOL-250M[アクアロンの登録商標]である。

[illegible]

試薬中の必要な酸化還元メディエーターの酸化型の有効量は測定しようとする分析物の濃度範囲によって左右される。グルコース(ここに記載された)を分析するための試薬は、容量約10〜約70 μ lのヒト全血の試料中のグルコースレベルを測定するのに十分な酸化還元メディエーター(酸化型)を含む。電極4および5の間に電位差が印加される場合、対電極の表面での酸化還元メディエーターの酸化型の量が作用電極での酸化還元メディエーターの還元型の量を超えるように十分な酸化還元メディエーターの酸化型を試薬に供給しなければならない。

-12-

(Aqualon)から入手可能な微結晶性カルボキシメチルセルロース]である。試薬中のAVICELの量は約1%~約4.2%(重量:容量)の範囲であってよく、好ましくは約1.4%(重量:容量)である。試薬中のNATROSOLの量は約0%~約0.3%(重量:容量)の範囲であってよく、好ましくは約0.06%(重量:容量)である。(これらのパーセンテージは電極表面上で乾燥する前の試薬組成物に関する。)

該試薬にAVICELおよびNATROSOLを添加した場合、上記範囲内で、該試薬中に混合されてよいヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸カリウムの量は、約0.15モル(M)~約0.7Mの範囲であってよく、好ましくは約0.3Mである。ヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩の濃度が0.15M以下である場合および0.7M以上である場合は、バイオセンサーの性能は低下する。(これらのモル濃度は電極表面上で乾燥する前の試薬組成物に関する。)

また、試薬は測定されるべき分析物を含有する試料を湿潤させるのに十分なタイプおよび充分な量の界面活性剤を含むのが好ましい。

酸、ピペラジン-N,N-ビス(2-エタンスルホン酸)、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸、N-トリス(ヒドロキシメチル)-メチル-2-アミノエタンスルホン酸、およびN-2-ヒドロキシエチル-ピペラジン-N-2-エタンスルホン酸、およびトリス緩衝液(2-アミノ-2(ヒドロキシメチル)-1,3-プロパンジオールから誘導された緩衝液)を含む。[「良」およびトリス緩衝液はシグマ・ケミカル・カンパニー(Sigma Chemical Company)から入手可能である。]イミダゾールは緩衝液として使用するべきではない。これらの緩衝液は約4~約8の好ましいpH範囲を提供するのに使用され得る。最も好ましいpH範囲は約6~約7である。最も好ましい緩衝液は約0.1M~約0.5M、好ましくは約0.4Mのリン酸塩(例えば、リン酸カリウム)である。(これらの濃度範囲は電極表面上で乾燥する前の試薬組成物に関する。)

試薬は、さらに、試薬を安定させるのに十分なタイプおよび充分な量の試薬安定剤を含むのが好ましい。該試薬安定剤は酵素を安定

特表平5-505459 (13)

例えば、グルコース含有ヒト全血試料分析用試薬において、該界面活性剤はノニオン界面活性剤である。該試薬中の界面活性剤約0%(重量:容量)~約0.3%(重量:容量)が存在し得る。界面活性剤約0.3%(重量:容量)以上では、赤血球が溶血し始める。グルコース試薬中の好ましい界面活性剤は好ましい濃度が約0.05%(重量:容量)のTRITON X-100[シグマ・ケミカル・コーポレーション(Sigma Chemical Corporation)から入手可能]である。(これらのパーセンテージは電極表面上で乾燥する前の試薬組成物に関する。)

酵素機能について満足なpHを提供し、かつ酸化還元メディエーターの還元型よりも高い酸化電位を有するという前記必要条件を満足するいずれの緩衝液も使用し得る。

酵素グルコースオキシダーゼを使用するグルコース試薬に関するこのような緩衝液の例は、リン酸塩、クエン酸塩(クエン酸塩は試薬を安定させるのを助ける)、「良」緩衝液(例えば、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、N-(2-アセトアミド)イミド二酢

させ、グルコースオキシダーゼを含有するグルコース試薬については、該試薬安定剤はグルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、ブルーデキストランおよびトレハロースからなる群から選択され得る。グルコースオキシダーゼを含有する試薬について好ましい試薬安定剤は約0%(重量:容量)~約4%(重量:容量)の濃度範囲、好ましくは約2%(重量:容量)の濃度のグルタミン酸塩(例えば、グルタミン酸カリウム)である。(これらのパーセンテージは電極表面上で乾燥する前の試薬組成物に関する。)

酵素グルコースオキシダーゼおよび酸化還元メディエーターの酸化型としてヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩を使用する好ましいグルコース試薬を作成するプロトコルは以下のとおりである:

工程1-pH 6.25の水溶性リン酸カリウム緩衝液(一塩基性リン酸カリウム80.062gおよび二塩基性リン酸カリウム26.423gを含む)0.740MにNATROSOL-250M 1.2000gを添加することによって緩衝液/NATROSOL混合物1gを(メスフラスコ中で)調製する。3時間、NATROSOLを攪拌お

よび影響させる。

工程2 - 20分間、AVICEL RC-591 F 14.94) 00gおよび水504.7750gを攪拌することによってAVICEL混合物を調製する。

工程3 - 緩衝液/NATROSOL混合物514.6000gにTRITON X-100 0.5000gを添加することによってTRITON混合物を調製し、15分間攪拌する。

工程4 - 攪拌しつつ、滴下漏斗またはビューレットを用いて合計AVICEL混合物に合計TRITON混合物を滴下する。添加終了後、一晩攪拌し続ける。

工程5 - 攪拌しつつ、工程4から得た混合物にヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸カリウム98.7750gを添加する。(ヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸カリウムを一度に少量ずつ加えて添加と同時にヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸カリウムを溶解させる。)

工程6 - 20分間、工程5の得られた混合物を攪拌する。

工程7 - 水酸化カリウムを添加することによって、工程6から

鉄(Ⅲ)酸塩の還元を触媒する酵素(グルコースオキシダーゼ)も含有するであろう。

次いで、試薬11を約50℃で約3分間加熱することによって乾燥する。乾燥によって試薬の含水量の少なくとも約90%を除去し、この結果、以下の割合の成分を有する好ましい乾燥試薬が得られる：乾燥試薬1g当たりヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩約1.1～約1.5ミリモル；試薬乾燥による酵素活性75%損失(異常に高い酵素活性損失)を仮定して乾燥試薬1g当たりグルコースオキシダーゼ約2,300～約2,600単位、試薬乾燥による酵素活性のより典型的な6%損失を仮定して乾燥試薬1g当たりグルコースオキシダーゼ約8,600～約9,600単位、および試薬乾燥による酵素活性の損失がないと仮定してグルコースオキシダーゼ約9,200～約10,400単位；乾燥試薬1g当たりリン酸塩緩衝液約1.3～約1.9ミリモル；乾燥試薬1g当たりNATROSOL-250 M約2～約3mgおよび乾燥試薬1g当たりAVICEL RC-591 F約50～約71mg(乾燥試薬1g当たり微結晶性物質の合計約52～

特表平5-505459 (14)

得られた混合物のpHを6.25に調整する。

工程8 - 工程6の得られた混合物にグルタミン酸カリウム20gを添加し、少なくとも20分間攪拌する。

工程9 - 工程8の得られた混合物にグルタミン酸カリウム20gを添加し、少なくとも20分間攪拌する。

工程10 - 100ミクロンのシーブバッグを介して、工程9の得られた混合物を濾過して如何なるAVICEL塊をも除去する。濾液は得られた試薬組成物であり、これを電極表面に添加し、次いで、乾燥する。

グルコース測定に関する好ましい具体例において、前記プロトコルによって作成した試薬8μlを切欠部8によって形成されたウェル9に添加する。この試薬11の量は、両電極上の表面積10を實質的に被覆するであろうし(第1図および第2図)、約20秒以内で完了させるのに充分な量のヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩、および充分な量の、グルコース(ヒト全血の試料由来)の酸化およびヘキサシアノ

約74mg)；乾燥試薬1g当たりグルタミン酸塩約71～約102mg；ならびに乾燥試薬1g当たりTRITON X-100約2～約3mg。

前記のとおり、配合試薬(乾燥前)の各成分は所定の制限範囲内で変化し得る。したがって、前記の乾燥したグルコース試薬は以下の広範囲な成分を含む：乾燥試薬1g当たりヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩約0.55～約3.5ミリモル；試料乾燥による酵素活性の75%損失(異常に高い酵素活性の損失)を仮定して乾燥試薬1g当たり約570単位を超えるグルコースオキシダーゼ；試料乾燥による酵素活性のより典型的な6%損失を仮定して乾燥試薬1g当たり約2100単位を超えるグルコースオキシダーゼ；乾燥試薬1g当たりリン酸塩約0.35～約2.6ミリモル；乾燥試薬1g当たりNATROSOL-250 M約0～約15mgおよび乾燥試薬1g当たりAVICEL RC-591 F約36～約213mg(乾燥試薬1g当たり微結晶性物質の合計約36～約228mg)；乾燥試薬1g当たりグルタミン酸塩約0～約200mg；ならびに乾燥試薬1g当たりTRIT

ON X-100 約0~約18 μ g。

乾燥後、好ましくは、ポリエステルまたはナイロンメッシュ(15) (第2図および第3図)を乾燥試薬の上部に置いて、輸送および管理中のバイオセンサーからの試薬の損失防止を促進し、試薬からヒト汚染を最小限度にするのを助ける。穴15を含む接着テープ14によって本発明装置にメッシュ13を貼付する(第2図および第3図)。穴15は本発明装置によって測定されるべき分析物を含有する試料を添加するための標的域である(第3図)。

試薬を乾燥し、メッシュを貼付した後、ロール成形バイオセンサーを打抜きによって切り離し、該バイオセンサーは、1) 作用電極および対電極と電気的に連結しており、かつ作用電極の表面での酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに十分な電位差を作用電極および対電極間に供給することができる電源、ならびに2) 作用電極および対電極と電気的に連結しており、かつ上記電位差が印加されると酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって生じる拡散限定電流を測定することができる計量器を接続

て液体試料中の分析物の濃度を測定してよい:

a) 作用電極および対電極の実質的に同一の表面積を実質的に被覆する試薬(前記)と液体試料を接触させ;

b) 分析物および酸化還元メディエーターの酸化型間の反応を完全に行わせ;

c) 次に、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに十分な電位差を電極間に印加し;

d) その後、得られた拡散限定電流を測定し;

e) 液体中の分析物の濃度と電流測定値を関連させる。

多くの分析物含有液体を分析し得る。例えば、全血、血清、尿および脳脊髄液のようなヒト体液中の分析物を測定し得る。また、発酵産物中、および環境汚染物を潜在的に含有する環境物質中に見られる分析物を測定し得る。

ヒト体液、特に全血中に見られる分析物を測定する場合、電極間に印加された電位差は、約500ミリボルト以下であるべきである。約500ミリボルト以上の電位差を電極間に印加すると、作用電極

特表平5-505459 (15)

して使用される。

前記計量器は、通常、電流測定器である。前記計量器の精度は、分析物の濃度と電流の間に適切な関係が得られるように、これによって分析物濃度が提供され、目に見えるように表示される。このような電源および計量器の改良は、同時に譲渡された米国特許第4,963,814号(1990年10月16日発行)、および米国特許出願第07/451,212号(1989年12月15日出願; 1990年11月6日許可通知発行; 1990年11月30日登録料支払)、第07/451,108号(1989年12月15日出願; 1990年9月24日許可通知発行; 1990年10月31日登録料支払)および第07/451,309号(1989年12月15日出願)の対象であり、これらの記載は本明細書に引用記載する。

電源および計量器の簡易な電気的連結のために、作用電極および対電極の部分を暴露するさらなる切欠部(第1図~第3図)がバイオセンサー装置中に提供されるのが好ましい。

上記バイオセンサー装置を使用して、以下の工程を行うことによ

表面(パラジウムについて)およびいくつかの血液成分の酸化が耐えられなくなり得、これによって電流の分析物濃度との正確かつ厳格な関連が防げる。酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(Ⅱ)酸塩である場合の全血試料におけるグルコースのアッセイについて、電極間に約150ミリボルト~約500ミリボルトの電位差を印加して、作用電極の表面での酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気酸化を達成してよい。好ましくは、電極間に約300ミリボルトの電位差を印加する。

酸化還元メディエーターの還元型の酸化から生じる電流は、電極間に電位差を印加した約0.5秒~約30秒後のいずれの時にも測定し得る。約0.5秒未満では、拡散限定電流は達成されなかった。約30秒後、対流が有意になり、これによって拡散限定電流の測定を妨げられる。好ましくは、電極間に電位差を印加した約10秒後に電流を測定し、測定された電流を試料中の分析物濃度と関連させる。

ヒト全血試料由来のグルコースの好ましい分析方法において、前

記の好ましいグルコース試薬に全血20 μ lを加える。グルコースおよびヘキサシアノ鉄(III)酸塩の反応を完全に行わせ、これに(46)でグルコン酸およびヘキサシアノ鉄(II)酸塩を形成する。この反応は、通常、完全に行わせるのに短い時間を要し、好ましい具体例においては、該反応は約20秒未満で完全に行われる。全血試料の添加の約30秒後に、電極間に約300ミリボルトの電位差を印加し、これによって作用電極の表面でヘキサシアノ鉄(II)酸塩をヘキサシアノ鉄(III)酸塩に酸化する。電極に該電位差を印加した約10秒後、電流を測定し、血液試料中のグルコースの濃度と関連させる。

試料のグルコース濃度は、本発明のバイオセンサーを使用する本発明の方法によって正確かつ厳格に測定され得る。さらに、ヒト全血試料を測定した場合、ヘマトクリット効果による誤差は有意ではない。

本発明の變形として、対電極が作用電極よりも小さくてよい。対電極が作用電極よりも小さい場合、試薬11に供給される酸化還元メディエーターの酸化型の量は増加しなければならない。電流に分

エーターの還元型が触媒量の酵素(例えば、リダクターゼ)の存在下で酸化される液体試料中の分析物濃度のそんていをするために使用してもよい。分析物、酵素および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応が完了に達した後、電極間に電位差を印加する。対電極(この場合、カソードよりもむしろアノード)での酸化還元メディエーターの還元型の量および印加された電位差は、作用電極(この場合、アノードよりもむしろカソード)の表面での酸化還元メディエーターの酸化型の拡散限定電気還元を生じるのに充分でなければならない。作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって生じた拡散限定電流を分析される試料中の分析物濃度と関連させる。

酸化還元メディエーターは容易に可逆でなければならない。試薬11中の酸化還元メディエーターの還元型の量は、電気還元中に生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって確實に限定するのに充分でなければならない。

また、緩衝液は、酸化還元メディエーターの酸化型の還元電位よ

特表平5-505459 (16)

析物の濃度を正確に関連させるための前記必要条件が満足されな

なければならない：すなわち、 特表平5-505459

1) 酸化還元メディエーターの還元型の酸化速度は作用電極の表面に対する酸化還元メディエーターの還元型の拡散速度によって左右され；

2) 生じた電流は作用電極の表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって限定される

ので、試薬11中の酸化還元メディエーターの酸化型の量は増加しなければならない。

例えば、対電極が作用電極の約半分の大きさである場合にヘキサシアノ鉄(III)酸塩約2700ナノモルおよびヘキサシアノ鉄(II)酸塩約900ナノモルの混合物(水20 μ lに溶解)は前記必要条件を満足した。

また、本発明は酸化される分析物および触媒量の酵素の存在下で還元される酸化還元メディエーターによって説明された。しかし、本発明装置、試薬および方法は、分析物が還元され、酸化還元メディ

よりも低い還元電位を有しなければならない。分析物、酵素および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を該酵素が触媒するpHを提供し維持するのに充分なタイプおよび充分な量でなければならない。これらおよび他の必要条件は還元よりもむしろ酸化される分析物を測定するための必要条件と似ている。

当業者が本発明を製造および使用し、本発明を実施するための最良のモードを知り、他の発明および従来の発明と本発明を区別することができるほど充分に明瞭かつ簡明に上記説明および図面において本発明を記載した。本発明の多くの變形および明白な適用は容易に考えられるであろうし、これらは以下に請求される発明の範囲内に含まれることを意図する。

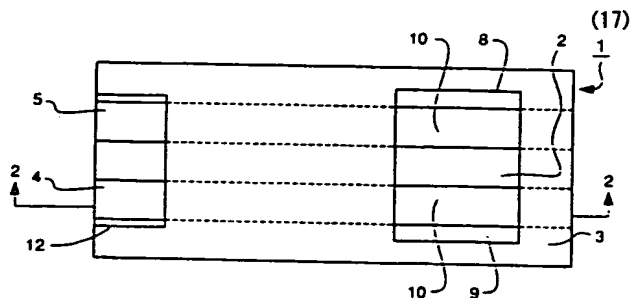


FIG. 1

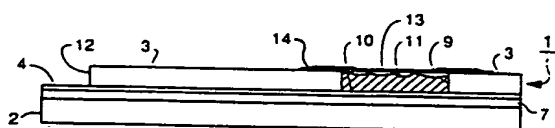


FIG. 2

要 約 書

新規バイオセンサーおよびその使用方法。該バイオセンサーは同一の導電性物質から作られた実質的に同一の大きさの作用電極および対電極を含む。

該試薬は作用電極および対電極の一部の実質的に等しい表面積を被覆する。該試薬は酸化還元メディエーター、酵素、および緩衝液を含む。

該試薬に分析物含有試料を添加すると、酸化還元メディエーターが還元される(少なくとも1個の電子を受容する)かまたは酸化される(少なくとも1個の電子を供与する)かいずれかである反応において、分析物、酵素、および酸化還元メディエーターが沈殿する。一般に、この反応において、分析物は酸化され、酸化還元メディエーターは還元される。この反応(ここで、分析物が酸化され、酸化還元メディエーターが還元される)が完了した後、電極間に電位差を印加する。対電極での酸化還元メディエーターの酸化型の量および印加された電位差は、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの

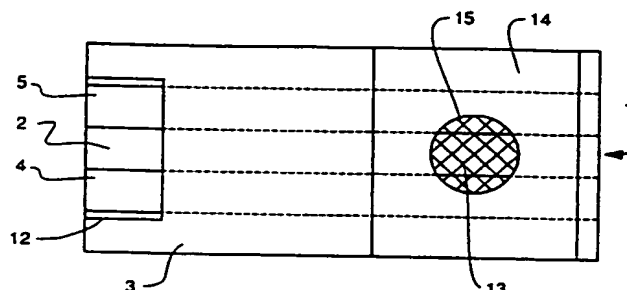


FIG. 3

還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに充分でなければならない。

短時間遅延の後、酸化還元メディエーターの還元型の電気酸化によって生じる電流を測定し、観察された電流は該試料中の分析物の量と関連される。

該薬が、作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって、電気酸化中に生じる電流を確実に限定するのに充分な量の酸化還元メディエーターの酸化型を含む場合、同一の導電性物質から作られた実質的に同一の大きさの2つの電極が必要だけであるのが重要である。

作用電極での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって限定されるべき電気酸化中に生じる電流について、対電極の表面での酸化還元メディエーターの酸化型の量は常に作用電極の表面での酸化還元メディエーターの還元型の量を超えなければならない。

[illegible]

| | |
|--|---|
| FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET <div style="border: 1px solid black; height: 100px; width: 100%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; font-size: 24px; font-weight: bold;">特表平5-505459</div> |
| * OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNREACHABLE * | |
| The international search report may not have proceeding in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons: | |
| <input type="checkbox"/> Claim numbers: | because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: |
| | |
| <input type="checkbox"/> Claim numbers: | because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to be met or stated that no meaningful international search can be carried out, satisfactorily: |
| | |
| <input type="checkbox"/> Claim numbers: | because they are dependent claims not drafted in accordance with the required and true conditions of ICT Rule 6.4(a) |
| | |
| WHERE OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING: | |
| The International Searching Authority found multiple inventions in the international application as follows: | |
| I. Process and apparatus for performing process of detection of an analyte by a biosensor, classified in class 435, subclass 288 (claims 1-15, 24-33 and 36-57); | |
| II. A reagent classified in class 435, subclass 14 (claims 16-23, 34 and 35). | |
| <input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application. | |
| <input type="checkbox"/> As all some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, satisfactorily claims: | |
| | |
| <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the maximum fees paid in the claims (it is covered by claim number): | |
| | |
| <input type="checkbox"/> As an exceptional circumstance could be ascertained without effort pertaining to dependent fee, the International Searching Authority did not make a determination of any additional fee | |
| <input type="checkbox"/> The applicant search fees were not submitted to expedite a process. | |
| <input type="checkbox"/> The applicant acknowledged the payment of additional search fees. | |

第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. '

識別記号

室内整理番号

| | | | |
|---|----|---|--------|
| G | 01 | N | 27/28 |
| | | | 27/416 |
| C | 12 | M | 1/34 |
| C | 12 | Q | 1/00 |
| | | | 1/26 |
| | | | 1/54 |

3 3 1 Z 7235-2 J
E 7229-4 B
B 6807-4 B
6807-4 B
6807-4 B
7235-2 J

G 01 N 27/46 3 3 6 Z

⑦発 明 者 オウクス，エム・ルーアン

⑦発 明 者 コスト，ケント・エム

⑦発 明 者 ペイトソン、ジョウジフ・イー

⑫発 明 者 ウォーリング，ビー・ダグラス

⑦発 明 者 ボールマン，クラウス・ハー

アメリカ合衆国46234インディアナ州、インディアナポリス、チャ
ペル・ハインズ・ドライブ8510番

アメリカ合衆国46038インディアナ州、フィッツシャーズ、アシュリ
イ・ブレイス11229番

アメリカ合衆国46038インディアナ州、フィッツシャーズ、イースト・ナインティエイス・ストリート6380番

アメリカ合衆国46256インディアナ州、インディアナポリス、シー
ブリーズ・ウェイ10216番

ドイツ連邦共和国デー6823ノイルスハイム、エルフルター・ヴェーク1番

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成9年(1997)10月14日

【公表番号】特表平5—505459

【公表日】平成5年(1993)8月12日

【年通号数】

【出願番号】特願平3—502803

【国際特許分類第6版】

G01N 27/327

27/28 331

27/416

// C12M 1/34

C12Q 1/00

1/26

1/54

【F I】

G01N 27/30 353 R 0275-2J

27/28 331 Z 0275-2J

C12M 1/34 E 7804-4B

C12Q 1/00 B 7823-4B

1/26 7823-4B

1/54 7823-4B

G01N 27/30 353 F 0275-2J

27/46 336 Z 0275-2J

手続補正書

平成 8 年 12 月 10 日

特許庁長官様

2. 事件の表示

平成 03 年特許願第 502803 号



3. 補正をする者

事件との関係 特許出版人

名称 ベーリンガー・マンハイム・コーポレーション

3. 代理人

住所 〒540
大阪府大阪市中央区船見1丁目3番7号 IMPビル
青島事務所内
電話 (05) 242-1251
FAX (05) 242-0351

氏名 林 通士 (6211) 青島 所



4. 補正命令の目的

自発 (出願書正誤求と同時)

5. 補正の対象

明細書
請求の範囲

オキシダーゼ約5,000~約0,400単位、および試験乾燥による酵素活性の損失がないと仮定してグルコースオキシダーゼ約5,400~約6,800単位；乾燥試薬1g当たりリン酸緩衝液約1.0~約1.3ミリモル；乾燥試薬1g当たりNATROSOL-250 M約1.6~約2.1mgおよび乾燥試薬1g当たりAVICEL RC-591 F約38~約48mg(乾燥試薬1g当たり微結晶性物質の合計約40~約50mg)；乾燥試薬1g当たりグルタミン酸塩約0.3~約0.4ミリモル；ならびに乾燥試薬1g当たりTRITON X-100約1.3~約1.7mg。」と補正します。

(7) 第25頁第5行~第26頁第1行

「したがって、……約18mg。」とあるを、

「したがって、乾燥試薬(試薬の水分の少なくとも90%が除去されている)における各成分の量の数値範囲は、上述の好ましい製剤の範囲より広い。」と補正します。

B. 請求の範囲

別紙の通り。

6. 補正の内容

A. 明細書

(1) 第1頁第2行

「新規バイオセンサーおよびその使用方法」とあるを、

「酸化還元メディエーターおよびバイオセンサー」と補正します。

(2) 第5頁第2行

「酸化還元メ」とあるを、「酸化還元メディエーター」と補正します。

(3) 第15頁第1行

「国際単位(単位)」とあるを、「単位」と補正します。

(4) 第18頁第1行

「カルボキシメチルセルロース」とあるを、

「ヒドロキシメチルセルロース」と補正します。

(5) 第19頁第15行~第20頁第1行

「(例えば、……緩衝液)」とあるを、

「(例えば、2-(N-ホルホルノ)エタンスルホン酸、N-(2-アセトアミド)-2-イミド酢酸、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸、N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸、およびN-2-ヒドロキシエチル-ピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸、およびトリス緩衝液(2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1,3-プロパンジオールから調製された緩衝液)」と補正します。

(6) 第24頁第6行~第25頁第3行

「乾燥試薬……約3mg。」とあるを、

「乾燥試薬1g当たりヘキサシアノ鉄(II)酸塩約0.8~約1.0ミリモル；試験乾燥による酵素活性75%損失(異常に高い酵素活性損失)を仮定して乾燥試薬1g当たりグルコースオキシダーゼ約1,300~約1,700単位、試験乾燥による酵素活性のより典型的な8%損失を仮定して乾燥試薬1g当たりグルコース

請求の範囲

1. a. 第1電気絶縁体；

b. 同一の導電性物質から作られ、かつ第1電気絶縁体上に支持されている実質的に同一の大きさの作用電極、および、逆置電極でない対電極；

c. 第1電気絶縁体および電極上に吸着し、かつ作用電極および対電極の実質的に等しい表面積を有する切欠部を含む第2電気絶縁体；ならびに

d. 切欠部において暴露される賦電表面を實質的に被覆し、かつ酸化還元メディエーターの酸化型、酵素および緩衝液からなる試薬からなり、

該酸化還元メディエーターの酸化型が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応から少なくとも1個の電子を受容するのに充分なタイプであり、かつ該限定電極酸化によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって確実に限定するのに充分な量であり、該酵素が酵素、分析物および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を触媒するのに充分なタイプおよび充分な量であり、

該緩衝液が酸化還元メディエーターの還元型よりも高い酸化電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに充分なタイプおよび充分な量であることを特徴とする分析物分析装置。

2. 試薬がさらに、試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに充分なタイプおよび充分な量の凝結性物質からなる請求項1記載の装置。

3. 試薬がさらに、少なくとも1つのさらなる酵素およびさらなる酸化還元メディエーターからなる請求項1記載の装置。

4. 作用電極および対電極の導電性物質がパラジウム、白金、金、銀、チタン、銅および炭素からなる群から選択される請求項1記載の装置。

5. 試薬がさらに、分析物を含有する試料を電解させるのに充分なタイプおよび充分な量の界面活性剤からなる請求項2記載の装置。

6. 試薬がさらに、試薬を安定させるのに充分なタイプおよび充分な量の試験安定剤からなる請求項5記載の装置。

1. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(II)酸塩であり、酵素がグルコースオキシダーゼである請求項1記載の装置。

8. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(II)酸塩であり、酵素がグルコースオキシダーゼである請求項2記載の装置。

11. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(II)酸塩であり、界面活性剤がリン酸塩であり、微結晶性物質が微結晶性セルロースおよび微結晶性ヒドロキシメチルセルロースを含み、酵素がグルコースオキシダーゼであり、界面活性剤がニオン界面活性剤であり、試薬安定剤がグルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、ブルーデキストラン、およびトレハロースからなる群から選択される請求項6記載の装置。

10. a. 第1電気絶縁体;
- b. パラジウムから作られ、かつ第1電気絶縁体上で支持される実質的に同一の大きさの作用電極、および、参照電極でない対電極;
- c. 第1電気絶縁体および電極に上塗りし、かつ作用電極および対電極の実質的に等しい表面積を露出する切欠部を含む第2電気絶縁体; ならびに
- d. 切欠部において露出される電極表面を実質的に被覆し、かつ
 - 1) 試薬1g当たりヘキサシアノ鉄(II)酸塩約0.8〜約1.0ミリモル、
 - 2) 試薬1g当たりリン酸塩緩衝液約1.0〜約1.3ミリモル、
 - 3) 試薬1g当たりグルコースオキシダーゼ約1.300〜約6.800単位、
 - 4) 試薬1g当たり微結晶性セルロース約3.8〜約4.8mg、
 - 5) 試薬1g当たり微結晶性ヒドロキシメチルセルロース約1.6〜約2.1mg、
 - 6) 試薬1g当たりTRITON X-100約1.3〜約1.7mg、および
 - 7) 試薬1g当たりグルタミン酸塩約0.3〜約0.4ミリモル

からなる試薬

ーターの酸化型を含む反応から少なくとも1個の電子を受容するのに十分なタイプであり、かつ拡散限定電気酸化によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって確実に限定するのに十分な量であり、

該酵素が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を触媒するのに十分なタイプおよび十分な量であり、

該緩衝液が酸化還元メディエーターの還元型よりも高い酸化電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに十分なタイプおよび十分な量であることを特徴とする、作用電極、および、参照電極でない対電極を有し、かつ分析物を測定する電気化学的装置のための試薬。

15. 試薬がさらに、少なくとも1つのさらなる酵素およびさらなる酸化還元メディエーターからなる請求項14記載の試薬。

16. さらに、試薬中で酸化還元メディエーターを分岐させるのに十分なタイプおよび十分な量の微結晶性物質からなる請求項14記載の試薬。

17. さらに、分析物含有試料を調製させるのに十分なタイプおよび十分な量の界面活性剤からなる請求項15記載の試薬。

18. さらに、試薬を安定させるのに十分なタイプおよび十分な量の試薬安定剤からなる請求項17記載の試薬。

19. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(II)酸塩であり、緩衝液がリン酸塩であり、微結晶性物質が微結晶性セルロースおよび微結晶性ヒドロキシメチルセルロースを含み、酵素がグルコースオキシダーゼであり、界面活性剤がニオン界面活性剤であり、試薬安定剤がグルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、ブルーデキストラン、およびトレハロースからなる群から選択される請求項18記載の試薬。

20. a. 試薬1g当たりヘキサシアノ鉄(II)酸塩約0.3〜約1.0ミリモル;

b. 試薬1g当たりリン酸塩緩衝液約1.0〜約1.3ミリモル、

c. 試薬1g当たりグルコースオキシダーゼ約1.300〜約6.800単位;

からなることを特徴とするグルコース分析装置。

11. さらに、

e. 作用電極および対電極と電気的に連絡され、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに十分な電位差を作用電極および対電極間に供給することができる電路; ならびに

1. 作用電極および対電極と電気的に連絡し、作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって生じる拡散限定電流を測定することができる計測器

からなる請求項1記載の装置。

12. さらに、

e. 作用電極および対電極と電気的に連絡され、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに十分な電位差を作用電極および対電極間に供給することができる電路; ならびに

f. 作用電極および対電極と電気的に連絡し、作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって生じる拡散限定電流を測定することができる計測器

からなる請求項1記載の装置。

13. 第2電気絶縁体がさらに作用電極および対電極の一部を露出するとする切欠部を含み、該露出がさらに、

e. さらに、切欠部で作用電極および対電極と電気的に連絡され、かつ作用電極の表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに十分な電位差を作用電極および対電極間に供給することができる電路; ならびに

f. 作用電極および対電極と電気的に連絡し、作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって生じる拡散限定電流を測定することができる計測器

からなる請求項10記載の装置。

14. 酸化還元メディエーターの酸化型、酵素、および緩衝液からなり、該酸化還元メディエーターの酸化型が酵素、分析物、および酸化還元メディエ

d. 試薬1g当たり微結晶性セルロース約3.8〜約4.8mg;

e. 試薬1g当たり微結晶性ヒドロキシメチルセルロース約1.6〜約2.1mg;

f. 試薬1g当たりTRITON X-100約1.3〜約1.7mg; および

g. 試薬1g当たりグルタミン酸塩約0.3〜約0.4ミリモル

からなることを特徴とする、作用電極、および、参照電極でない対電極を有し、かつグルコースを測定する電気化学的装置のための試薬。

21. a. 作用電極、および、参照電極でない対電極の実質的に等しい表面積を露出し、かつ酸化還元メディエーターの酸化型、酵素、および緩衝液を含む試薬と液体を接触させ

[ここで、酸化還元メディエーターの酸化型は酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応から少なくとも1個の電子を受容するのに十分なタイプであり、かつ拡散限定電気酸化によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって確実に限定するのに十分な量であり、

該酵素は酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を触媒するのに十分なタイプおよび十分な量であり、

該緩衝液は酸化還元メディエーターの還元型よりも高い酸化電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに十分なタイプおよび十分な量である];

b. 該酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を完了させ;

c. 次に、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気酸化を生じるのに十分な電位差を電極間に印加し;

d. その後、生じる拡散限定電流を測定し;

e. 液体中の分析物の濃度と電流測定値を関連させる

工程からなることを特徴とする液体中の分析物濃度測定方法。

22. 試薬がさらに、少なくとも1つのさらなる酵素およびさらなる酸化還元

メディエーターを含む請求項3に記載の方法。

3.3. 試薬がさらに、試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに充分なタイプおよび充分量の微結晶性物質を含む請求項2に記載の方法。

3.4. 試薬がさらに、試薬との接触によって試薬を溶解させるのに充分なタイプおよび充分量の界面活性剤、および試薬を安定させるのに充分なタイプおよび充分量の試薬安定剤を含む請求項2に記載の方法。

3.5. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(Ⅱ)酸塩であり、酸塩がリン酸塩であり、微結晶性物質が微結晶性セルロースおよび微結晶性ヒドロキシメチルセルロースを含み、酵素がグルコースオキシダーゼであり、界面活性剤がノニオン界面活性剤であり、試薬安定剤がグルキミン酸塩、アスパラギン酸塩、ブルーデキストラン、およびトレハロースからなる群から選択される請求項2に記載の方法。

3.6. a. 作用電極、および、参照電極でない対電極の實質的に等しい表面積を被覆し、かつ

試薬1g当たりヘキサシアノ鉄(Ⅱ)酸塩約0.9〜約1.0ミリモル、

試薬1g当たりリン酸塩酸塩約1.0〜約1.3ミリモル、

試薬1g当たりグルコースオキシダーゼ約1.0〜約0.80g単位、

試薬1g当たり微結晶性セルロース約3.8〜約4.8g、

試薬1g当たり微結晶性ヒドロキシメチルセルロース約1.5〜約2.1g、

および

試薬1g当たりグルタミン酸塩約0.3〜約0.4ミリモル

を含む試薬と液体を接触させ、

b. 酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を完了させ、

c. 次いで、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気還元を生じるのに充分な電位差を電極間に印加し、

e. 作用電極および対電極と電気的に連絡され、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電気還元を生じるのに充分な電位差を作用電極および対電極間に供給することができる装置；ならびに

f. 作用電極および対電極と電気的に連絡し、作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって生じる拡散限定電流を測定することができる計量器

からなる請求項2に記載の装置。

3.0. 酸化還元メディエーターの還元型、酵素、および緩衝液からなり、

該酸化還元メディエーターの還元型が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応から少なくとも1個の電子を供与するのに充分なタイプであり、かつ拡散限定電気還元によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって確實に測定するのに充分な量であり、

該酵素が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を触媒するのに充分なタイプおよび充分な量であり、

該緩衝液が酸化還元メディエーターの酸化型よりも低い還元電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに充分なタイプおよび充分な量である

ことを特徴とする、作用電極、および、参照電極でない対電極を有し、かつ分析物を測定する電気化学的装置のための試薬。

3.1. さらに、

試料中で酸化還元メディエーターを分散させるのに充分なタイプおよび充分量の微結晶性物質；

分析物含有試料を溶解させるのに充分なタイプおよび充分量の界面活性剤；

および

試薬を安定させるのに充分なタイプおよび充分量の試薬安定剤からなる請求項3.0に記載の装置。

3.2. a. 作用電極、および、参照電極でない対電極の實質的に等しい表面積を被覆し、かつ酸化還元メディエーターの還元型、酵素、および緩衝液を含む

d. その後、生じる拡散限定電流を測定し；

e. 液体中のグルコースの濃度を電流測定値に関連させる工程からなることを特徴とする液体中のグルコース濃度測定方法。

2.1. a. 第1電気絶縁体；

b. 同一の導電性物質から作られ、かつ第1電気絶縁体上で支持される實質的に同一の大きさの作用電極、および、参照電極でない対電極；

c. 第1電気絶縁体および電極に上塗りし、かつ作用電極および対電極の實質的に等しい表面積を被覆する切欠部を含む第2電気絶縁体；および

d. 切欠部において暴露される電極表面を實質的に被覆し、かつ酸化還元メディエーターの還元型、酵素、および緩衝液からなる試薬からなり、

該酸化還元メディエーターの還元型が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応から少なくとも1個の電子を供与するのに充分なタイプであり、かつ拡散限定電気還元によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって確實に測定するのに充分な量であり、

該酵素が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を触媒するのに充分なタイプおよび充分な量であり、

該緩衝液が酸化還元メディエーターの酸化型よりも低い還元電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに充分なタイプおよび充分な量であることを特徴とする分析物分析用装置。

2.3. 試薬がさらに、

試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに充分なタイプおよび充分量の微結晶性物質、

分析物含有試料を溶解させるのに充分なタイプおよび充分量の界面活性剤、

および

試薬を安定させるのに充分なタイプおよび充分量の試薬安定剤からなる請求項2.1に記載の装置。

2.2. さらに、

試薬と液体を接触させ

〔ここで、酸化還元メディエーターの還元型は酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応から少なくとも1個の電子を供与するのに充分なタイプであり、かつ拡散限定電気還元によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって確實に測定するのに充分な量であり、

該酵素は酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を触媒するのに充分なタイプおよび充分な量であり、

該緩衝液は酸化還元メディエーターの酸化型よりも低い還元電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに充分なタイプおよび充分な量である〕；

b. 該酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を完了させ；

c. 次いで、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの酸化型の拡散限定電気還元を生じるのに充分な電位差を電極間に印加し；

d. その後、生じる拡散限定電流を測定し；

e. 液体中の分析物の濃度と電流測定値を関連させる工程からなることを特徴とする液体中の分析物濃度測定方法。

3.3. 試薬がさらに、

試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに充分なタイプおよび充分量の微結晶性物質、

分析物含有試料を溶解させるのに充分なタイプおよび充分量の界面活性剤、

および

試薬を安定させるのに充分なタイプおよび充分量の試薬安定剤を含む請求項3.2に記載の方法。

3.4. a. 第1電気絶縁体；

b. 同一の導電性物質から作られ、かつ第1電気絶縁体上で支持されている作用電極および対電極よりも小さく、参照電極でない対電極；

c. 試験1電気絶縁体および対電極に上塗りし、作用電極よりも小さい対電極の表面積を露出する切欠部を含む第2電気絶縁体；および

d. 切欠部において露出された電極表面を実質的に被覆し、かつ酸化還元メディエーターの酸化型、酵素、および試薬液からなる試薬からなり、

該酸化還元メディエーターの酸化型が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応から少なくとも1個の電子を受容するのに十分なタイプであり、かつ該制限電位酸化によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって確実に限定するのに十分な量であり、

該酵素が酵素、分析物および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を触媒するのに十分なタイプおよび十分な量であり、

該試薬液が酸化還元メディエーターの還元型よりも高い酸化電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに十分なタイプおよび十分な量であることを特徴とする分析物分析装置。

35. 試薬がさらに、試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに十分なタイプおよび十分な量の微結晶性物質からなる請求項34記載の装置。

36. 試薬がさらに、少なくとも1つのさらなる酵素およびさらなる酸化還元メディエーターからなる請求項34記載の装置。

37. 作用電極および対電極の導電性物質がパラジウム、白金、金、銀、チタン、銅、および炭素からなる群から選択される請求項34記載の装置。

38. 試薬がさらに、分析物含有試料を露出させるのに十分なタイプおよび十分な量の界面活性剤からなる請求項35記載の装置。

39. 試薬がさらに、試薬を安定化させるのに十分なタイプおよび十分な量の試薬安定剤からなる請求項35記載の装置。

40. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(II)酸塩であり、酵素がグルコースオキシダーゼである請求項34記載の装置。

するpHを提供し維持するのに十分なタイプおよび十分な量である]；

b. 該酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を完了させ；

c. 次に、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電位酸化を生じるのに十分な電位差を電極間に印加し；

d. その後、生じる拡散限定電流を測定し；

e. 液体中の分析物の濃度と電流値との関連させる

工程からなることを特徴とする液体中の分析物濃度測定方法。

45. 試薬がさらに、少なくとも1つのさらなる酵素およびさらなる酸化還元メディエーターを含む請求項44記載の方法。

46. 試薬がさらに、試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに十分なタイプおよび十分な量の微結晶性物質を含む請求項44記載の方法。

47. 試薬がさらに、

試薬との接触によって液体を露出させるのに十分なタイプおよび十分な量の界面活性剤、および

試薬を安定化させるのに十分なタイプおよび十分な量の試薬安定剤を含む請求項44記載の方法。

48. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(II)酸塩であり、緩衝液がリン酸塩であり、微結晶性物質が微結晶性セルロースおよび微結晶性ヒドロキシメチルセルロースを含む、酵素がグルコースオキシダーゼであり、界面活性剤がノニオン界面活性剤であり、試薬安定剤がグルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸、およびトレハロースからなる群から選択される請求項47記載の方法。

49. a. 第1電気絶縁体；

b. 同一の導電性物質から作られ、かつ第1電気絶縁体上で支持される作用電極、および、該作用電極よりも小さい、参照電極でない対電極；

c. 第1電気絶縁体および電極に上塗りし、かつ作用電極よりも小さい対電極の表面積を露出する切欠部を含む第2電気絶縁体；および

41. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(II)酸塩であり、酵素がグルコースオキシダーゼである請求項35記載の装置。

42. 分析物がグルコースであり、酸化還元メディエーターの酸化型がヘキサシアノ鉄(II)酸塩であり、緩衝液がリン酸塩であり、微結晶性物質が微結晶性セルロースおよび微結晶性ヒドロキシメチルセルロースを含む、酵素がグルコースオキシダーゼであり、界面活性剤がノニオン界面活性剤であり、試薬安定剤がグルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸、およびトレハロースからなる群から選択される請求項35記載の装置。

43. さらに、

e. 作用電極および対電極と電気的に連絡され、かつ作用電極の表面で酸化還元メディエーターの還元型の拡散限定電位酸化を生じるのに十分な電位差を作用電極および対電極間に供給することができる電源；および

f. 作用電極および対電極と電気的に連絡し、かつ作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって生じる拡散限定電流を測定することができる計器

からなる請求項41記載の装置。

44. a. 作用電極よりも小さい対電極の表面積を被覆し、かつ酸化還元メディエーターの酸化型、酵素、および試薬液を含む試薬と液体を接触させ

[ここで、酸化還元メディエーターの酸化型が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応から少なくとも1個の電子を受容するのに十分なタイプであり、かつ該制限電位酸化によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの還元型の酸化によって確実に限定するのに十分な量であり、

該酵素が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を触媒するのに十分なタイプおよび十分な量であり、

該試薬液は酸化還元メディエーターの還元型よりも高い酸化電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの酸化型を含む反応を酵素が触媒

d. 切欠部において露出された電極表面を実質的に被覆し、かつ酸化還元メディエーターの還元型、酵素、および緩衝液からなる試薬からなり、

該酸化還元メディエーターの還元型が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応から少なくとも1個の電子を供与するのに十分なタイプであり、かつ該制限電位酸化によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって確実に限定するのに十分な量であり、

該酵素が酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を触媒するのに十分なタイプおよび十分な量であり、

該試薬液が酸化還元メディエーターの酸化型よりも低い還元電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに十分なタイプおよび十分な量であることを特徴とする分析物分析装置。

50. 試薬がさらに、

試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに十分なタイプおよび十分な量の微結晶性物質、

分析物含有試料を露出させるのに十分なタイプおよび十分な量の界面活性剤、

および

試薬を安定化させるのに十分なタイプおよび十分な量の試薬安定剤からなる請求項49記載の装置。

51. さらに、

e. 作用電極および対電極と電気的に連絡され、かつ作用電極の表面で酸化還元メディエーターの酸化型の拡散限定電位酸化を生じるのに十分な電位差を作用電極および対電極間に供給することができる電源；および

f. 作用電極および対電極と電気的に連絡し、作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって生じる拡散限定電流を測定することができる計器

からなる請求項49記載の装置。

52. a. 作用電極よりも小さい、参照電極でない対電極の表面積を被覆し、

かつ酸化還元メディエーターの還元型、酵素、および緩衝液を含む試薬と試料と試料を接触させ

【ここで、酸化還元メディエーターの還元型は酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応から少なくとも1個の電子を供与するのに十分なタイプであり、かつ拡散限定電気還元によって生じる電流を作用電極表面での酸化還元メディエーターの酸化型の還元によって確実に安定するのに十分な量であり、

該試薬は酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を触媒するのに十分な量であり、

該緩衝液は酸化還元メディエーターの酸化型よりも低い還元電位を有し、かつ酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を酵素が触媒するpHを提供し維持するのに十分なタイプおよび十分な量である】；

b. 該酵素、分析物、および酸化還元メディエーターの還元型を含む反応を完了させ；

c. 次に、作用電極の表面で酸化還元メディエーターの酸化型の拡散限定電気還元を生じるのに十分な電位差を電極間に印加し；

d. その後、生じる拡散限定電流を測定し；

e. 試料中の分析物の濃度と電流測定値を関連させる

工程からなる試料中の分析物濃度測定方法。

5.1. 試薬がさらに、

試薬中で酸化還元メディエーターを分散させるのに十分なタイプおよび十分な量の微結晶性物質、

試薬と接触させることによって試料を溶解させるのに十分なタイプおよび十分な量の界面活性剤、および

試料を安定させるのに十分なタイプおよび十分な量の試薬安定剤からなる請求項5.2記載の方法。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.